

04

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Oktober 2001 (25.10.2001)

PCT

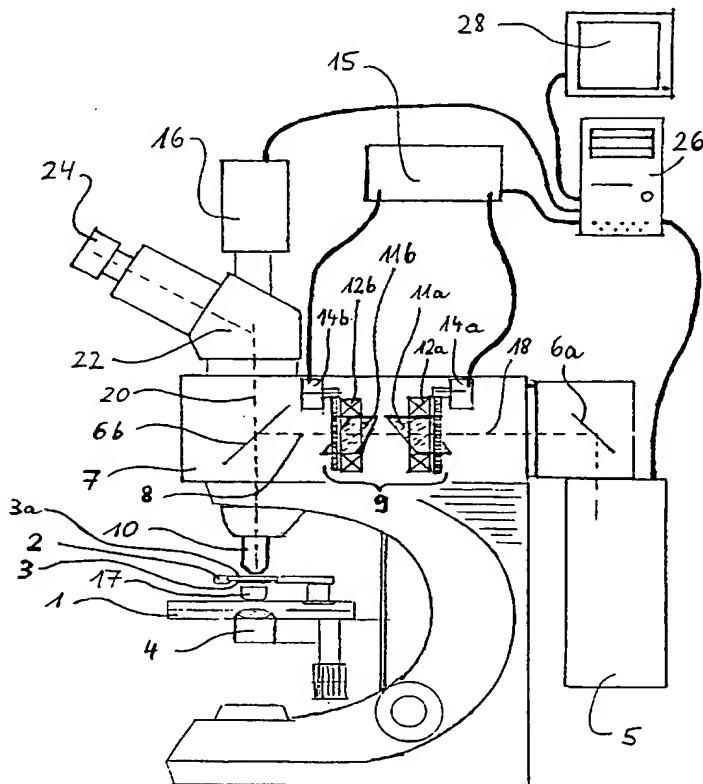
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/78937 A1

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation⁷:
G02B 21/32</p> <p>(21) Internationales Aktenzeichen:
PCT/DE01/01227</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum:
29. März 2001 (29.03.2001)</p> <p>(25) Einreichungssprache:
Deutsch</p> <p>(26) Veröffentlichungssprache:
Deutsch</p> <p>(30) Angaben zur Priorität:
100 18 253.4 13. April 2000 (13.04.2000) DE</p> | <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LEICA MICROSYSTEMS WETZLAR GMBH [DE/DE]; Postfach 20 40, 35578 Wetzlar (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEISS, Albrecht [DE/DE]; Schillerstrasse 18, 35440 Linden (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, JP, KR, MX, RU, SG, US, ZA.</p> <p>(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).</p> |
|---|---|

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: LASER MICRODISSECTION DEVICE

(54) Bezeichnung: LASER-MIKRO-DISSEKTIONSGERÄT



(57) Abstract: The invention relates to a laser microdissection device comprised of a microscope table (1), which supports a specimen (3) to be dissected, of an incident lighting device (7), a laser light source (5) and of an objective (10) for focussing the laser beam (18) of the laser light source (5) onto the specimen (3). According to the invention, the microscope table (1) is not moved during the dissecting process. A laser scanning device (9) is arranged in the incident lighting device (7), is comprised of two thick glass wedge plates (11a, 11b), which are tilted toward the optical axis (8) and can be rotated independently of one another around said optical axis (8). In addition to the beam deviation caused by the wedge angle of the wedge plates (11a, 11b), a beam offset of the laser beam (18) is produced by the thickness and the tilt of the wedge plates (11a, 11b). When both wedge plates (11a, 11b) are rotated, the beam deviation and the beam offset of the laser beam (18) are varied in such a manner that the laser beam (18) always passes through the middle of the objective pupil (19) and, at the same time, the beam is guided over the specimen (3) to be dissected by the beam deviation of the laser beam (18).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 01/78937 A1

Laser-Mikro-Dissektionsgerät

Die Erfindung betrifft ein Laser-Mikro-Dissektionsgerät mit den Merkmalen des Oberbegriffs des unabhängigen Anspruchs 1.

- Bekannte Geräte zur Laser-Mikrodissektion umfassen eine Auflicht-
- 5 Einrichtung, in deren Strahlengang ein UV-Laserstrahl eingekoppelt wird. Das UV-Laserlicht wird durch den Auflichtstrahlengang geführt und durch ein Mikroskop-Objektiv auf ein Präparat fokussiert, das auf einem motorisch verfahrbaren Mikroskoptisch (Scanningtisch) aufliegt. Die mit dem UV-
- 10 Laserlicht erzeugte hohe Energiedichte in dem Fokus wird dazu benutzt, im Präparat zu schneiden (= zu dissektionieren). Eine Schnittlinie wird dadurch erzielt, dass beim Schneiden der Mikroskoptisch verfahren wird, um das Präparat relativ zu dem feststehenden Laserstrahl zu bewegen. In der Regel arbeitet man mit gepulsten Lasern. Dabei entsteht durch einen Laserpuls ein kleines Loch in dem Präparat. Eine Schnittlinie entsteht durch passendes
- 15 Aneinanderreihen solcher Löcher. Dazu muss der Mikroskoptisch insbesondere bei stark vergrößernden Objektiven eine hohe Positioniergenauigkeit besitzen, um präzise Schnitte zu ermöglichen. Solche Mikroskoptische sind teuer.

- Beim Bewegen des Präparats um den Schneidpunkt des Laserstrahls
- 20 erscheint dem Beobachter auch das Bild bewegt. Insbesondere störend ist dies, wenn die Beobachtung mit einer langsamen Kamera und einem Monitor erfolgt. Das Monitorbild verschwimmt dann und zeigt ruckartige Veränderungen. Es wäre daher aus Anwendersicht günstiger, beim Schneiden den Mikroskoptisch und damit das Präparat feststehen zu lassen.

Präparat,
welches folgende neue Merkmale aufweist:

- a) dass der Mikroskoptisch bezüglich der x-y-Richtung beim Schneiden feststehend angeordnet ist,
- 5 b) und dass in der Auflicht-Einrichtung eine Laser-Scan-Einrichtung angeordnet ist, die aus zwei dicken, gegen die optische Achse geneigten und unabhängig von einander um die optische Achse drehbaren Glas-Keilplatten besteht, welche durch ihre Keilwinkel eine Strahlablenkung erzeugen, wobei durch die Drehung der Glas-
10 Keilplatten der resultierende Ablenkwinkel α des Laserstrahls gegenüber der optischen Achse variabel ist,
- c) und dass der Laserstrahl am Ausgang der Scan-Einrichtung durch die Dicke und die Schrägstellung der Glas-Keilplatten einen seitlichen Strahlversatz gegenüber der optischen Achse aufweist und für alle
15 Ablenkwinkel α die Mitte der Objektiv-Pupille des Objektivs trifft.

Die technische Besonderheit besteht in der Ausgestaltung und räumlichen Anordnung der beiden Keilplatten.

Es sind zwar bereits optische Einheiten bekannt, mit denen man eine Strahlablenkung erzeugen kann. So wäre es denkbar, eine Strahlablenkung
20 des Laserstrahls im Bereich der Auflicht-Einrichtung zu realisieren, indem der Laserstrahl entweder eine optische Einheit aus zwei gegeneinander verschiebbaren Linsen (sogenannter Abat'scher Keil) oder eine optische Einheit aus zwei gegeneinander verdrehbaren, dünnen Glas-Keilen durchtritt. Diese optischen Einheiten haben jedoch den Nachteil, dass der Laserstrahl
25 ausschließlich eine Strahlablenkung erfährt und dann außerhalb der Pupille des Objektivs auftrifft. Damit erreicht er nicht mehr das zu schneidende Präparat. Anordnungen mit den genannten optischen Einheiten eignen sich daher nicht zum Einsatz als Laser-Scan-Einrichtung.

Ein erfindungsgemäßes Laser-Mikro-Dissektionsgerät weist daher im
30 Laserstrahlengang eine Laser-Scan-Einrichtung auf, die aus zwei dicken

Mit dem erfindungsgemäßen Laser-Mikro-Dissektionsgerät ist es möglich, das zu schneidende Präparat ortsfest zu lassen und den Laser-Schneidpunkt mit geringem technischem Aufwand über das Präparat zu bewegen. Zugleich ist der erfindungsgemäße Aufbau der Laser-Scan-Einrichtung aus zwei dicken, geneigten, drehbaren Keilplatten wesentlich einfacher und preiswerter als bekannte Strahlscanner. In dem erfindungsgemäßen Laser-Mikro-Dissektionsgerät kann auf einen teuren motorischen xy-Tisch (Scanningtisch) verzichtet werden, denn die Schnittqualität ist unabhängig von der Positioniergenauigkeit des Mikroskoptisches. Als Laserlichtquelle kann ein Laser im ultravioletten (UV) oder infraroten (IR) oder im sichtbaren (VIS) Spektralbereich verwendet werden.

Trifft der von der Laser-Scan-Einrichtung abgelenkte Laserstrahl ein Objektiv, so ist bekanntlich für alle Objektivvergrößerungen die Auslenkung im Objekt proportional zur Objektivvergrößerung. Ist der maximale Ablenkwinkel α gerade so groß, dass der Laserstrahl bis zum Sehfeldrand abgelenkt wird, so gilt dies für alle Objektive unabhängig von deren Vergrößerung. Das bedeutet, dass die Ortsauflösung der Laser-Scan-Einrichtung im Sehfeld für alle Objektive gleich ist. Zum Durchfahren einer Schnittlinie über das gesamte Sehfeld werden für alle Objektive die gleichen Winkелеinstellungen der beiden Keile nacheinander angefahren.

Hier liegt der große Vorteil des erfindungsgemäßen Laser-Mikro-Dissektionsgerätes mit der beschriebenen Laser-Scan-Einrichtung gegenüber einem vorbekannten Laser-Mikro-Dissektionsgerät, das mit einem feststehenden Laserstrahl und einem bewegten xy-Tisch arbeitet. Bei einem bewegten xy-Tisch muss dessen Positionierung mit zunehmender Objektivvergrößerung und damit kleinere Schnittbreite im Objekt immer genauer erfolgen.

Im Gegensatz dazu führt bei der erfindungsgemäßen Laser-Scan-Einrichtung eine gegebene Winkelauflösung für die Keildrehung bei schwachen

- 5
- a) Definieren einer Schnittlinie mittels der Maus auf dem Monitor,
 - b) rechnerische Zerlegung der Schnittlinie in eine Reihe von aneinandergrenzenden Schnittlöchern, deren Mittelpunkte den während des Schneidvorgangs auf dem Präparat einzunehmenden Soll-Positionen des Laserstrahls entsprechen,
 - c) Berechnung des Ablenk winkels α des Laserstrahls zu jeder einzelnen einzunehmenden Position und Berechnung der zugeordneten Drehstellungen der Glas-Keilplatten,
 - 10 d) Erzeugen der Steuersignale für die motorische Drehung der Glas-Keilplatten,
 - e) und Erzeugen der definierten Schnittlinie durch Ablenken des Laserstrahls in die berechneten Soll-Positionen durch Drehen der Glas-Keilplatten.

15 Da die angegebene Laser-Scan-Einrichtung eine sehr exakte Führung des abgelenkten Laserstrahls erlaubt, sind auch andere Verwendungen des erfindungsgemäßen Laser-Mikro-Dissektionsgerätes möglich. So kann beispielsweise der von der Laser-Scan-Einrichtung abgelenkte Laserstrahl zur Materialbearbeitung angewendet werden.

20 In einer anderen Verwendungsform wird der abgelenkte Laserstrahl computergesteuert geführt und es werden mit ihm Oberflächen beschriftet.

In einer dritten Verwendungsform des erfindungsgemäßen Laser-Mikro-Dissektionsgerätes wird der abgelenkte Laserstrahl als optische Pinzette benutzt, indem mit ihm einzelne Partikel erfasst und transportiert werden.

25 Die Erfindung wird anhand eines Ausführungsbeispiels mit Hilfe der schematischen Zeichnung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 : ein erfindungsgemäßes Laser-Mikro-Dissektionsgerät;

Keilplatten 11a, 11b erfolgt mittels zweier zugeordneter Schrittmotoren 14a, 14b, wobei der Schrittmotor 14a an dem Zahnrad 13a und der Schrittmotor 14b an dem Zahnrad 13b angreift.

- Die beiden Schrittmotoren 14a, 14b sind mit einer Schrittmotor-
- 5 Steuerungseinheit 15 verbundenen, welche die Steuersignale zur Ansteuerung der beiden Schrittmotoren 14a, 14b liefert. Die Schrittmotorsteuerung ist mit einem Rechner 26 verbunden, an den ein Monitor 28 angeschlossen ist. Auf dem Monitor 28 wird das von einer Kamera 16 aufgenommene Bild des Präparats 3 dargestellt. Auf dem Monitor 28 kann
- 10 mittels einer Rechner-Maus (nicht dargestellt) eine Schnittlinie definiert werden. Der Rechner 26 ist außerdem mit der Laserlichtquelle 5 verbunden und liefert diesem Triggersignale zum Auslösen von Laserpulsen, wenn die Glas-Keilplatten 11 a, b durch die Schrittmotoren 14 a, b in die Sollposition für die Schnittlinie gebracht wurden.
- 15 Durch Drehung der beiden Glas-Keilplatten 11a, 11b erscheint der Laserstrahl am Ausgang der Laser-Scan-Einrichtung 9 unter verschiedenen Ablenkswinkeln und durchläuft das Objektiv 10 jeweils durch die Mitte der Objektiv-Pupille. Dabei kann der Laserstrahl durch Variation des Ablenkswinkels auf beliebige Positionen auf dem Präparat 3 geführt werden,
- 20 die innerhalb des Sehfeldes des Objektivs 10 liegen. Durch geeignete Ansteuerung der Drehung der beiden Glas-Keilplatten 11a, 11b kann auf dem Präparat 3 eine Schnittlinie erzeugt werden. Der ausgeschnittene Teil des Präparats 3 fällt durch die rahmenförmige Aussparung in der Präparat-Halterung 2 in ein Auffanggefäß 17, das unterhalb des Präparats 3 auf dem
- 25 Mikroskopisch 1 angeordnet ist.

Der Strahlenverlauf des Laserstrahls in der Laser-Scan-Einrichtung 9 wird in den **Fig. 2a** und **2b** verdeutlicht. Gezeigt wird die schematische Anordnung von zwei Glas-Keilplatten 11a, 11b in einer Laser-Scan-Einrichtung 9. In **Fig. 2b** ist zur Verdeutlichung der Keilwinkel β einer der beiden Glas-Keilplatten

30 (11a, 11b) dargestellt. Als Keilwinkel β bezeichnet man die Winkeldifferenz

Die vorliegende Erfindung ist in Bezug auf Ausführungsbeispiele beschrieben worden, es jedoch für jeden auf diesem Fachgebiet tätigen Fachmann offensichtlich, dass Änderungen und Abwandlungen vorgenommen werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu
5 verlassen.

Patentansprüche

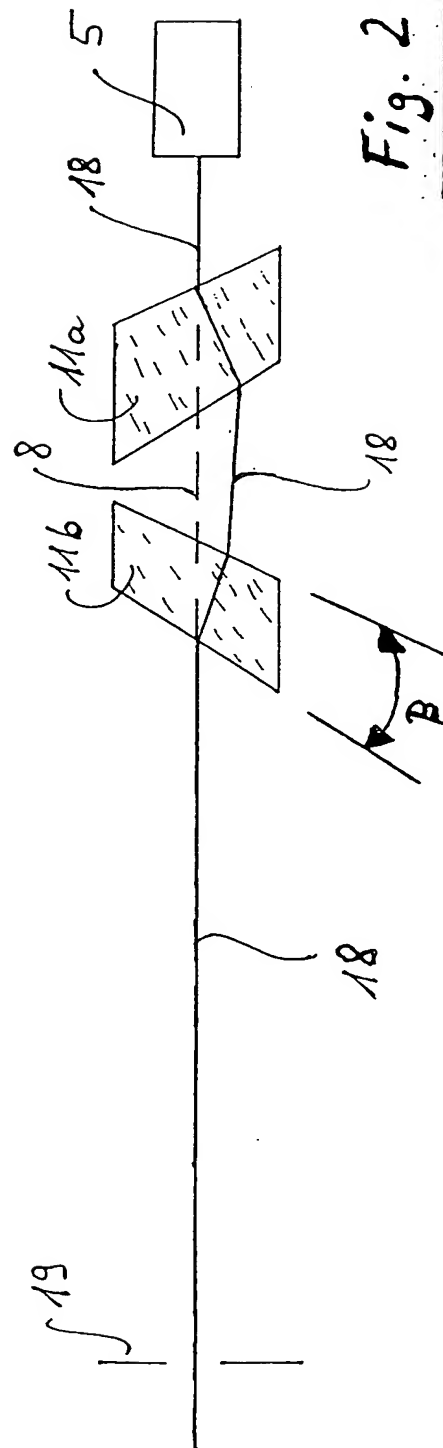
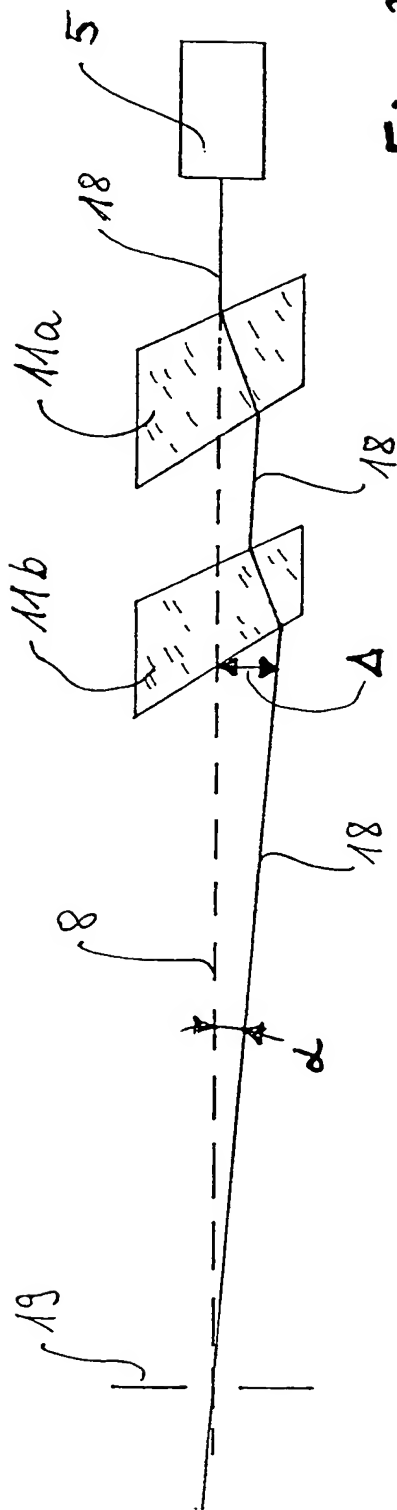
1. Laser-Mikro-Dissektionsgerät mit

- einem Mikroskoptisch (1), der ein zu schneidendes Präparat (3) trägt,
- 5 - und einer Auflicht-Einrichtung (7) mit einer optischen Achse (8) ,
- einer Laserlichtquelle (5) zur Erzeugung eines Laserstrahls (18)
- und einem Mikroskop-Objektiv (10) zum Fokussieren des Laserstrahls (18) auf das Präparat (3),

dadurch gekennzeichnet,

- 10 a) dass der Mikroskoptisch (1) bezüglich der x-Richtung und der y-Richtung beim Schneiden feststehend angeordnet ist,
- b) und dass in der Auflicht-Einrichtung (7) eine Laser-Scan-Einrichtung (9) angeordnet ist, die aus zwei dicken, gegen die optische Achse (8) geneigten und unabhängig von einander um
15 die optische Achse (8) drehbaren Glas-Keilplatten (11a, 11b) besteht, welche durch ihre Keilwinkel eine Strahlablenkung erzeugen, wobei durch die Drehung der Glas-Keilplatten (11a, 11b) der resultierende Ablenkwinkel α des Laserstrahls (18) gegenüber der optischen Achse (8) variabel ist,
- 20 c) und dass der Laserstrahl (18) am Ausgang der Laser-Scan-Einrichtung (9) durch die Dicke und die Schrägstellung der Glas-Keilplatten (11a, 11b) einen seitlichen Strahlversatz gegenüber der optischen Achse (8) aufweist und für alle Ablenkwinkel α die Mitte der Objektiv-Pupille (19) des Objektivs (10) trifft.

5. Verwendung eines Laser-Mikro-Dissektionsgerät nach Anspruch 4,
gekennzeichnet durch die Verfahrensschritte:
- a) Definieren einer Schnittlinie mittels der Maus auf dem Monitor (28),
 - b) rechnerische Zerlegung der Schnittlinie in eine Reihe von
5 aneinandergrenzenden Schnittlöchern, deren Mittelpunkte den
während des Schneidvorgangs auf dem Präparat (3)
einzunehmenden Soll-Positionen des Laserstrahls entsprechen,
 - c) Berechnung des Ablenk winkels α des Laserstrahls (18) zu jeder
10 einzelnen einzunehmenden Position und Berechnung der
zugeordneten Drehstellungen der Glas-Keilplatten (11a, 11b),
 - d) Erzeugen der Steuersignale für die motorische Drehung der Glas-
Keilplatten (11a, 11b),
 - e) und Erzeugen der definierten Schnittlinie durch Ablenken des
15 Laserstrahls (18) in die berechneten Soll-Positionen durch Drehen
der Glas-Keilplatten (11a, 11b).
6. Verwendung eines Laser-Mikro-Dissektionsgeräts nach Anspruch 1 ,
dadurch gekennzeichnet,
dass der von der Laser-Scan-Einrichtung abgelenkte Laserstrahl zur
Materialbearbeitung angewendet wird.
- 20 7. Verwendung eines Laser-Mikro-Dissektionsgeräts nach Anspruch 5 ,
dadurch gekennzeichnet,
dass der abgelenkte Laserstrahl computergesteuert geführt wird und
mit ihm Oberflächen beschriftet werden.
- 25 8. Verwendung eines Laser-Mikro-Dissektionsgeräts nach Anspruch 1 ,
dadurch gekennzeichnet,
dass der abgelenkte Laserstrahl als optische Pinzette benutzt wird,
indem mit ihm einzelne Partikel erfasst und transportiert werden.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Initial Application No
PCT/DE 01/01227

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9814816 A	09-04-1998	AU 4562497 A	24-04-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 01/01227

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9814816 A	09-04-1998	AU 4562497 A	24-04-1998

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)